

## ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу Кріль Ірини Йосифівни «Біохімічні та імунологічні зміни у крові за умов імунозапального артрити», подану на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія

**Актуальність теми дисертації.** Ревматоїдний артрит є системним аутоімунним захворюванням, що спричиняється складною взаємодією генетичних та екологічних чинників. Згідно з результатами сучасних досліджень рівень захворюваності населення планети на цю хворобу значно збільшився впродовж двох останніх десятиріч, причому значну частку пацієнтів складають особи працездатного віку. Тому з'ясування механізмів розвитку ревматоїдного артрити, в тому числі, моделюванням на експериментальних тваринах з метою його профілактики, діагностики та розробки ефективних методів лікування є однією з важливих медико-біологічних проблем.

Як відомо, захворювання характеризується хронічним перебігом запального процесу в суглобах, де відбувається активація мононуклеарних клітин та інтенсивне утворення активних форм Оксигену і Нітрогену. Однією з моделей такого процесу може слугувати карагенін-індукований набряк кінцівок у тварин, який спричиняє гострі й хронічні запальні реакції, схожі з тими, що виявляються у людей, хворих на ревматоїдний артрит. Іншою моделлю, яку широко використовують під час вивчення аутоімунних процесів, що лежать в основі ревматоїдного артрити, є колаген-індукований артрит у щурів, який характеризується розвитком клітинної та гуморальної ланок імунної відповіді на колаген II типу, що призводить до утворення сенсibiliзованих Т-лімфоцитів та продукції аутоантитіл. Однак біохімічні процеси, які задіяні у розвитку запалення у тварин під час застосування цих моделей, а також у патогенезі ревматоїдного артрити у людей, головним чином, оксидативні реакції, пов'язані із активністю моноцитів і макрофагів, на сьогодні недостатньо вивчені.

У цьому аспекті актуальною є тема дисертаційної роботи Кріль І.Й., яка скерована на дослідження процесів, що відбуваються у клітинах крові тварин за умов розвитку гострого і хронічного запалення, спричиненого введенням колагену та карагеніну, та порівняння встановлених ефектів із змінами біохімічних та імунологічних показників у хворих на ревматоїдний артрит пацієнтів. Використання зазначених експериментальних моделей має важливе значення для детального з'ясування молекулярно-біологічних змін, які супроводжують розвиток запальних процесів та розробки перспективних лікарських засобів, придатних для лікування хворих на ревматоїдний артрит.

### **Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.**

Дисертаційна робота є фрагментом планової теми кафедри клінічної імунології та алергології ЛНМУ імені Данила Галицького «Оцінка взаємозв'язку імунологічних, генетичних, гормональних механізмів, вторинних системних васкулітів та поліімунопатології за умов системних захворювань сполучної тканини та оцінка ефективності і безпеки застосування терапії супроводу біофлавоноїдів та бігуанідів» (2012–2016 р), номер державної реєстрації 0112U000166.

**Наукова новизна дослідження та одержаних результатів.** Наукова новизна дослідження полягає в тому, що в роботі вперше комплексно проаналізовані біохімічні показники сироватки крові на моделях гострого та хронічного артритів у експериментальних тварин (щури, миші), за умов моделювання гострого та хронічного запалення проведено дослідження фагоцитарної активності нейтрофілів і моноцитів та оксидативного вибуху в зазначених клітинах. Доповнено наукові дані щодо рівня утворення ранніх апоптичних клітин за умов розвитку гострого запального процесу та під час хронічного артриту, інтенсивності продукції активних форм кисню (зокрема, супероксидного та гідроксильного радикалів) і нітрогену на різних стадіях запалення суглобів, а також про вплив сірководню на розвиток запального процесу за експериментального ревматоїдного артриту. Вперше показано, що під час експериментального колагенового артриту у тварин та у пацієнтів з ревматоїдним артритом імуноглобуліни класу IgG сироватки крові виявляють протеолітичну активність щодо гістонів. Таким чином каталітична активність зазначених антитіл може слугувати потенційним біохімічним маркером прогнозування розвитку ревматоїдного артриту.

**Практичне значення результатів дослідження.** Результати, отримані під час виконання дисертаційної роботи, мають важливе практичне значення, оскільки дають можливість діагностувати різні патогенетичні типи запальних пошкоджень. Водночас у роботі доведено доцільність використання тваринних експериментальних моделей для дослідження клінічних форм розвитку захворювання у хворих на ревматоїдний артрит і спрогнозувати можливий тип формування стадій захворювання. Встановлено нові аспекти патогенезу ревматоїдного артриту на експериментальних тваринних моделях. Створено алгоритм біохімічних маркерів для диференційної діагностики розвитку запального процесу. Зокрема, визначення фагоцитарної активності нейтрофілів і моноцитів, процесів апоптозу лімфоцитів, вмісту активних форм кисню та нітрогену в лейкоцитах, а також протеолітичної активності імуноглобулінів сироватки крові є важливим для встановлення стадії запального процесу.

На сьогодні результати, отримані в роботі, зокрема, визначення рівня гістон-гідролізувальної активності IgG, використовують як діагностичний показник загострення розвитку ревматоїдного артриту на кафедрі клінічної імунології та алергології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького. Протеолітична активність препаратів IgG щодо гістонів, яка виявлена у сироватці крові хворих на ревматоїдний артрит, але відсутня у здорових донорів, робить цей показник потенційним біохімічним маркером прогнозування розвитку ревматоїдного артриту.

**Аналіз структури і змісту дисертаційної роботи.** Дисертаційна робота викладена на 139 сторінках комп'ютерного тексту, складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів власних досліджень, обговорення результатів, висновків, списку використаних джерел, що налічує 182 найменування. Дисертація містить 13 таблиць і 37 рисунків. Робота написана грамотно, матеріал викладено логічно і послідовно. У структурному відношенні робота відповідає встановленим вимогам щодо оформлення дисертаційних робіт.

У «Вступі» автор обґрунтовує актуальність проблеми та важливість вибраного напрямку досліджень для науки і практики, визначає мету, завдання, об'єкт і предмет досліджень, новизну та практичне значення результатів. Формулювання мети і завдань роботи, визначення об'єкту та предмету дослідження коректні. Перелік положень, які мають наукову новизну та практичне значення, відповідає суті виконаної роботи.

В огляді літератури, який складається із шести підрозділів, проаналізовані сучасні дані щодо патогенезу ревматоїдного артриту, участі імунних клітин у початкових фазах формування захворювання, а також ролі протеїнів та низькомолекулярних медіаторів запальних процесів при прогресуванні ревматоїдного артриту. Водночас описано молекулярні механізми, які задіяні в патогенезі пізніх фаз розвитку захворювання, значення сірководню як вторинного посередника в міжклітинній взаємодії. Детально розглянуто функціональну активність нейтрофілів та моноцитів периферичної крові, роль активних форм кисню та нітрогену, процесів апоптозу при різних стадіях розвитку хвороби. Охарактеризовано найбільш вивчені каталітично активні антитіла (абзими) в нормі та за умов патології. Розглянуті найчастіше використовувані експериментальні моделі ревматоїдного артриту на лабораторних тваринах.

У 2-му розділі дисертації описано вибір напрямів досліджень, схему експериментів та широкий набір методик, застосованих під час виконання експериментальної частини роботи. Описано принципи формування дослідних

груп щурів, методи спричинення у тварин та оцінки перебігу гострого (карагеніновий набряк) і хронічного (колагеновий артрит) запальних процесів, отримання експериментального матеріалу у тварин та хворих на ревматоїдний артрит і здорових осіб. Детально описано методи проведення аналітичних досліджень, зокрема, визначення фагоцитарної активності гранулоцитів та моноцитів, виявлення апоптотичних клітин, дослідження активності NO-синтаз у плазмі крові, рівня утворення  $O_2^{\cdot-}$  і OH-радикалу, виділення антитіл та визначення їх протеолітичної активності. Загалом у роботі використаний широкий набір сучасних методів, а саме: біохімічні (визначення вмісту продуктів оксидативних реакцій, активності ензимів у сироватці крові), цитологічні (фагоцитарна активність нейтрофілів та моноцитів, апоптоз, проточна цитофлуориметрія), фізико-хімічні (афінна хроматографія, електрофорез, високоефективна рідинна хроматографія) та статистичні. Застосовані методи є відповідними для реалізації завдань дисертаційної роботи.

Розділ 3, який присвячений опису результатів досліджень, складається з шести підрозділів. Зокрема, в 1-му підрозділі охарактеризовані морфологічні зміни в кінцівках щурів за умов гострого (карагенінового) і хронічного (колагенового) запалення, у 2-му – біохімічні показники сироватки крові тварин за умов запалення та у хворих на ревматоїдний артрит. Встановлено, що за умов колаген- та карагенін-індукованого артритів у щурів зростає рівень біохімічних маркерів запального процесу. Водночас за умов гострого запалення, зумовленого введенням карагеніну, відбувається гіперпродукція  $\alpha 1$  та  $\alpha 2$ -глобулінів, а за умов хронічного запалення – збільшення вмісту гамма-глобулінової фракції, що вказує на можливе залучення в патологічний процес гуморальної ланки імунної системи з імовірною гіперпродукцією аутоантитіл. Зростання вмісту  $\alpha 2$ - та  $\gamma$ -глобулінів відмічено і у пацієнтів, хворих на ревматоїдний артрит, на стадії ремісії хвороби.

У наступному підрозділі описані результати аналізу фагоцитарної активності нейтрофілів та моноцитів у крові лабораторних тварин і пацієнтів. Показано, що за експериментального артрити посилюється спонтанна фагоцитарна активність клітин, але після стимуляції здатність клітин до фагоцитозу зменшується. У пацієнтів з ревматоїдним артритом також виявлені зміни фагоцитарної активності фагоцитів, зокрема спонтанна фагоцитарна активність нейтрофілів і моноцитів зростає і під час загострення ревматоїдного артрити, і в хронічній стадії захворювання.

Значна увага в роботі приділена дослідженням оксидативних процесів у нейтрофілах і моноцитах піддослідних щурів і осіб, хворих на ревматоїдний артрит, а також показників оксидативного та нітрозативного стресу у крові

тварин. Показано, що за умов гострого та хронічного запального процесів відбувається підвищення концентрації біохімічних маркерів оксидативного і нітрозативного стресу та збільшується активність кальцій-незалежної індукцибельної NOS (особливо при хронічному запаленні). Крім того, у плазмі крові тварин проаналізована динаміка вмісту сірководню, який, як обґрунтовує автор, є перспективним показником під час прогнозуванні стану запалення та розвитку ускладнень у хворих на ревматоїдний артрит.

У матеріалах підрозділу 3.5 проаналізовано рівень апоптозу лімфоцитів у крові експериментальних тварин за умов розвитку карагенінового та колагенового артритів, а також у пацієнтів з ревматоїдним артритом. Зокрема, показано, що в експериментальних тварин при хронічному запаленні аналогічно як і у пацієнтів у стадії ремісії ревматоїдного артрити відбувається зростання рівня апоптичних клітин.

Останній підрозділ розділу «Результати досліджень» присвячений аналізу протеолітичної активності імуноглобулінів класу IgG, які виділяли з сироватки крові імунізованих гістонами та неімунізованих тварин. Встановлено, що препарати IgG сироватки крові імунізованих мишей здатні гідролізувати гістон H1, корові гістони та основний протеїн мієліну. IgG сироватки крові неімунізованих мишей не виявляли протеолітичної активності щодо цих протеїнів. Високий рівень протеолітичної активності препаратів IgG щодо гістонів також виявлено в IgG сироватки крові хворих на ревматоїдний артрит, але не в IgG клінічно здорових донорів. Таким чином, обґрунтовано значення досліджень каталітично активних антитіл з метою діагностики та прогнозування розвитку ревматоїдного артрити.

Розділ 4 присвячений узагальненню отриманих результатів, в якому автор проаналізувала експериментальні дані, отримані шляхом моделювання запальних процесів на лабораторних тваринах і під час дослідження хворих на ревматоїдний артрит пацієнтів.

На основі отриманих результатів сформульовано 8 висновків, які повністю віддзеркалюють основні етапи і зміст проведених автором експериментальних досліджень.

Зміст автореферату відповідає основним положенням дисертації.

**Повнота викладення матеріалів досліджень в опублікованих працях.** Результати дисертаційної роботи широко апробовані у наукових публікаціях, були представлені на наукових конгресах і міжнародних науково-практичних конференціях. Загалом за матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 13 наукових праць, із яких 7 статей (в тому числі 6 – у фахових вітчизняних та міжнародних наукових журналах) і 6 тез доповідей.

## **Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації та їхня достовірність.**

Дисертаційна робота виконана із використанням великої кількості експериментального матеріалу. Під час виконання експериментальних досліджень застосовані сучасні аналітичні методи, які є відповідними для вирішення основних завдань дисертаційної роботи. Отримані в роботі результати опрацьовані з використанням сучасних методів варіаційної статистики. Усі висновки ґрунтуються на фактично отриманих результатах проведених досліджень. Ступінь достовірності результатів, обґрунтованості наукових положень і висновків не викликає сумніву.

### **Недоліки по змісту і оформленню дисертаційної роботи.**

Принципових недоліків у дисертаційній роботі не виявлено, проте є деякі зауваження рекомендаційного характеру і запитання:

1. В огляді літератури варто було приділити більшу увагу питанням, які стосуються ролі екологічних та аліментарних чинників у розвитку ревматоїдного артриту, адже відомо, що ризик розвитку цієї хвороби зростає за умов нестачі в організмі таких мікроелементів, як Селен, Манган, Купрум.

2. Під час опису результатів не варто аналізувати недостовірні відмінності в значеннях досліджуваних показників. Зокрема, у підсумку до підрозділу 3.4.1 (ст. 87) відзначено, що концентрація сірководню за умов колагенового артриту була в 1,1 разу вищою, ніж за умов карагенінового запалення, хоча ця відмінність невірогідна. Аналогічно, в тексті розділу 3.2.1 вказано, що рівень сечовини у сироватці крові щурів вищий за умов карагенінового артриту порівняно з тваринами, у яких індукували колагеновий артрит, проте згідно з даними табл. 3.2 достовірної різниці в значеннях показника між дослідними групами тварин немає. На ст. 61 вказано, що «вміст фракції  $\gamma$ -глобулінів при загостренні ревматоїдного артриту був на 28% достовірно вищим, а при ремісії захворювання – на 35%, порівняно з групою контролю», проте згідно з даними таблиці 3.6 вірогідне збільшення цього показника є лише на стадії ремісії хвороби. На ст. 60 автор зазначає, що під час аналізу розподілу протеїнових фракцій у пацієнтів з ревматоїдним артритом не спостерігали статистично достовірних відмінностей (про це свідчать результати табл. 3.5), проте у «Підсумку», яким закінчується підрозділ 3.2.3 зазначено, що «при загостренні ревматоїдного артриту спостерігається незначне зниження фракції альбумінів та зростання глобулінової фракції».

3. Не зовсім вдалим є вислів «фізіологічна здатність організму», а також термін «фагоцитарна здатність» нейтрофілів і моноцитів, які автор вживає у

дисертаційній роботі. Коректнішим є термін «фагоцитарна активність» зазначених клітин.

4. Під час опису результатів автор іноді допускає неточності під час аналізу даних. Зокрема, у «Підсумку», яким закінчується підрозділ 3.3.1, вказано, що «при карагеніновому імунозапальному артриті спостерігалася значна активація фагоцитарних клітин, яка після стимуляції незначно зростала. При колагеновому експериментальному артриті фагоцити посилювали поглинальну здатність лише після стимуляції». Проте з результатів таблиць 3.7 і 3.8 випливає, що фагоцитарна активність нестимульованих нейтрофілів і моноцитів зростала за умов експериментального артриту, а стимульованих клітин – зменшувалась у тварин дослідних груп порівняно з контролем.

5. У дисертації показані результати досліджень рівня утворення супероксидного аніону та ОН-радикалу у плазмі піддослідних тварин. За таких умов варто було дослідити активність ензимів антиоксидантної системи, зокрема, глутатіонпероксидази, оскільки з наукових джерел відомо, що в організмі осіб, хворих на ревматоїдний артрит, часто виявляється нестача Селену.

6. Варто пояснити, чим зумовлюється різниця в інтенсивності кисеньзалежних процесів у нейтрофілах хворих на ревматоїдний артрит, а саме: зростання інтенсивності цих процесів у нестимульованих клітинах і після стимуляції fMLP, зниження цього показника в клітинах, стимульованих *E. coli*, та відсутність змін за умов стимуляції клітин під впливом РМА (ст. 78).

7. Чим, на думку автора, зумовлюється зниження рівня апоптозу лімфоцитів під час гострого артриту і збільшення кількості апоптичних клітин за умов хронічного (колагенового) артриту?

Проте зазначені зауваження не зменшують наукового і практичного значення дисертаційної роботи, яка є завершеним експериментальним дослідженням, присвяченим з'ясуванню актуальної наукової проблеми.

#### **Висновок.**

Дисертаційна робота Кріль Ірини Йосифівни «Біохімічні та імунологічні зміни у крові за умов імунозапального артриту» є завершеною науковою працею, у якій з використанням двох експериментальних моделей розвитку запальних процесів з'ясовано окремі ланки механізмів патогенезу ревматоїдного артриту. У роботі здійснено детальну характеристику біохімічних та імунологічних показників крові щурів за гострого (карагенінового) та хронічного (колагенового) запалення кінцівок, пацієнтів, хворих на ревматоїдний артрит і крові мишей за гістон-індукованої імунізації.

Вищевказане дає підставу вважати, що за актуальністю теми, обсягом проведених експериментальних досліджень та їх методичним рівнем, новизною отриманих результатів та практичним значенням робота відповідає вимогам МОН України до кандидатських дисертацій, зокрема п. 11 «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 р. № 567, а її автор Кріль Ірина Йосифівна заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія.

Офіційний опонент,  
професор кафедри екології Львівського  
національного університету імені Івана Франка,  
доктор біологічних наук, професор  
31.12.2015 р.

Антоняк Г.Л.

Підпис Г.Л. Антоняк засвідчую.

Вчений секретар Львівського національного університету  
імені Івана Франка, доцент

Грабовецька О.С.